Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor W. Stepp

Die Einwirkung ultravioletter Strahlen und Kurzwellen auf den Vitamin C-Gehalt verschiedener Flüssigkeiten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Siegfried Helmut Steinbach

aus Stuttgart

München 1939

Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor W. Stepp

Die Einwirkung ultravioletter Strahlen und Kurzwellen auf den Vitamin C-Gehalt verschiedener Flüssigkeiten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Siegfried Helmut Steinbach

aus Stuttgart

München 1939

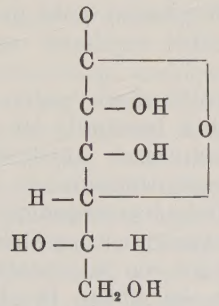
Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Referent:
Dr. habil. Dr. med. Schröder

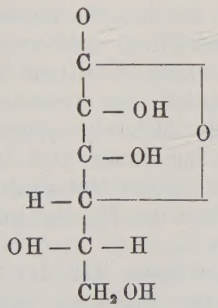
Tag der mündlichen Prüfung:
16. November 1939

Vor 12 Jahren wurde zum ersten Male von *Szent-Györgyi* das Vitamin C, die l-Ascorbinsäure, aus der Nebenniere des Rindes isoliert und seit 1933 wird es synthetisch dargestellt *(Reichenstein)*. Sie hat folgende Formel:

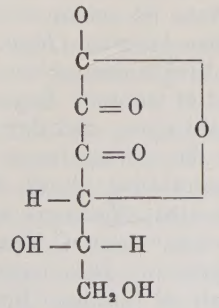


$C_6H_8O_6$ l-Ascorbinsäure.

Schon vor der Aufklärung der chemischen Konstitution der Ascorbinsäure war eine reduzierte (Ascorbinsäure) und eine oxydierte (Dehydroascorbinsäure) Form des Vitamins C bekannt.



$C_6H_8O_6$ l-Ascorbinsäure



$C_6H_8O_6$ Dehydro-l-Ascorbinsäure

Bereits sehr frühzeitig hatte man beobachtet, daß die antiskorbutische Wirksamkeit pflanzlicher Produkte durch Kochen und durch Lagern abnimmt und daß damit gleichzeitig auch eine Abnahme des Reduktionsvermögens der untersuchten Früchte verbunden ist. Eingehende Prüfungen über die Stabilität der reinen l-Ascorbinsäure zeigten, daß diese durch eine milde Oxydation in eine reversibel oxydierte physiologisch noch aktive Form übergeht. Auch *Tillmanns* und Mitarbeiter konnten zeigen, daß der reduzierende Anteil an Obstsäften und in Pflanzen mehrstufig oxydierbar ist, und bei der Behandlung mit Indophenolfarbstoffen, Jod und Wasserstoffsuperoxyd eine Oxydationsstufe bildet, die mit Schwefelwasserstoff in den ursprünglichen reduzierenden Körper zurückgeführt werden kann, ohne nach dieser Behandlung an antiskorbutischer Wirksamkeit einzubüßen *(Johnson)*. Durch weitere Oxydation geht nun diese primäre Oxydationsstufe in eine irreversibel oxydierte und damit physiologisch inaktive Form über.

Während die feste l-Ascorbinsäure gegen Luftsauerstoff, Lichteinfluß und Temperaturen sehr beständig ist, werden wässerige Lösungen dieses Stoffes ziemlich rasch oxydiert. Noch weit weniger haltbar ist aber die Dehydroascorbinsäure in wässeriger Lösung. In wenigen Stunden wird die Dehydroverbindung weitgehend abgebaut, jedoch im Gegensatz zu der Ascorbinsäure nicht durch den Sauerstoff der Luft. Sowohl bei Gegenwart von Sauerstoff, wie von Kohlensäure oder Stickstoff vollzieht sich der Abbau in gleicher Weise. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Tatsache, daß beim Zerfall der Dehydroascorbinsäure die antiskorbutische Wirksamkeit rascher verloren geht als die Regenerierbarkeit durch Schwefelwasserstoff. Dies weist darauf hin, daß die Dehydroascorbinsäure in einer antiskorbutisch aktiven und inaktiven Stufe vorliegen kann.

Daß auch Strahlen verschiedener Art auf die l-Ascorbinsäure einwirken, ist schon einige Male untersucht worden. So konnten verschiedene Autoren *(Reyher, Schloßmann* und *Zilva)* nachweisen, daß durch direkte Bestrahlung der Milch oxydationsempfindliche Vitamine geschädigt werden. *Reyher* und *Walkoff* konnten den erneuten Nachweis erbringen, daß der Vitamin C-Gehalt der Milch proportional der Menge des vorhandenen Sauerstoffs, sowie der Dauer und Intensität der Bestrahlung durch die Einwirkung der Ultravioletttstrahlen vernichtet wird. *Hottinger* wies nach, daß Proben des Handelspräparates „Ultractina" kein C-Vitamin mehr besaßen.

Supplee und *Dow* hatten ebenfalls nachgewiesen, daß der Vitamin C-Gehalt in flüssiger Frischmilch nachweisbar abnimmt, wenn diese in dünner Schicht einige Sekunden lang Ultravioletttstrahlen ausge-

setzt wird. Der Vitamin C-Gehalt der Trockenmilch blieb dagegen auch durch länger ausgedehnte Ultraviolettbestrahlung (3 – 20 Minuten Expositionsdauer) unbeeinflußt. *Kögel* konnte zeigen, daß Vitamine auch durch Röntgenstrahlen zerstört werden. Durch die Abhängigkeit der Röntgenstrahlenwirkung von der Konstitution wäre auch die Frage zu bejahen, daß bestimmte Wellenlängen auf bestimmte Vitamine spezifisch wirken. Eine Bestätigung dafür erbrachte *Kasahara*, der feststellen konnte, daß die l-Ascorbinsäure sogar durch die Einwirkung ultraakustischer Wellen leicht zerstört wird. Er glaubt die Ursache auf die intensive Durchdringlichkeit und kurzwellige Schwingung zurückführen zu müssen. Auch *H. Schroeder* konnte an einer ganzen Anzahl Versuche nachweisen, daß das Vitamin C in biologischen Flüssigkeiten durch Bestrahlungen mit Ultraviolettlicht oxydiert wird und ihre antiskorbutische Wirksamkeit dabei endgültig verloren geht.

Die Technik der Bestrahlung biologischer Flüssigkeiten forderte nun den Ausschluß des Sauerstoffs, da nach Ansicht verschiedener Autoren *(Hottinger, Wieland, Scheer)* dadurch die oxydationsempfindlichen Vitamine ihre Wirkung behalten sollen. Dies geschah nun bei Milchbestrahlungen nach dem *Scholl*schen Verfahren dadurch, daß diese vorher mit Kohlensäure gesättigt wurde. *Scheer* empfahl das Verfahren zur Herstellung von Prophylaxemilch gegen Rachitis. Eine andere Art der Bestrahlung wird mit dem *Scheidt*schen Apparat ausgeführt. Hierbei besteht die Lichtquelle aus einem System von Quarzröhren, die mit Edelgas gefüllt und mit hochgespanntem Wechselstrom gespeist werden. Dieses Verfahren wurde besonders von *Degwitz* für Therapiemilch empfohlen.

Obwohl nun verschiedentlich gezeigt werden konnte, daß der Vitamin C-Gehalt in biologischen Flüssigkeiten durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht weitgehend verändert wird, ist die Frage, inwieweit dies auch bei Ausschluß des Sauerstoffs geschieht noch nicht einwandfrei geklärt. Da jedoch diese Tatsache auch ernährungspolitisch von besonderer Wichtigkeit ist, haben wir es für notwendig erachtet, die Einwirkung der Ultraviolettbestrahlung auf Vitamin C-haltige Flüssigkeiten mit und ohne Sauerstoffausschluß einer nochmaligen eingehenden Prüfung zu unterziehen. Und zwar soll der Nachweis sowohl durch die chemische Bestimmung der l-Ascorbinsäure als auch durch die biologische Prüfung an Meerschweinchen erbracht werden. Ganz besonders interessierte uns auch die Einwirkung der Ultraviolettbestrahlung auf Vitamin C-haltige Flüssigkeiten in Stickstoffatmosphäre und damit unter Sauerstoffausschluß und der Einfluß von Kurzwellenbestrahlungen.

Methodik: Bei unseren Versuchen haben wir die Strahlen einer Quecksilberquarzlampe in etwa 30 cm Entfernung auf die zu prüfende Flüssigkeit einwirken lassen. Frische, rohe Milch, frische Preßsäfte und Harn brachten wir in einer 3—5 mm dicken Schicht in eine Petrischale und setzten sie der Bestrahlung aus. Der Wärmefaktor wurde weitgehendst ausgeschlossen dadurch, daß die Petrischale in ein mit Eis gefülltes Gefäß gebracht wurde. Die Temperatur der bestrahlten Flüssigkeit war dadurch ständig um 0 Grad Celsius. Kontrollversuche wurden unter denselben Bedingungen mit einer 60-Watt-Glühbirne gemacht. Den bestrahlten Flüssigkeiten entnahmen wir in gewissen Zeitabständen gleichlaufend Proben und bestimmten darin das Vitamin C nach der *Tillmann*schen Methode. Danach wird als Indikator ein blauer Farbstoff das 2,6-Dichlorphenolindophenol benutzt. Die bestrahlte Flüssigkeit wird in ein *Erlenmayer* Kölbchen gebracht (pipettiert) und jede Portion mit 1 ccm Eisessig angesäuert und mit etwa 100 ccm destilliertem Wasser verdünnt. Aus einer Bürette wird dann die Dichlorphenolindophenollösung so lange zugetropft bis die entstehende Rötung während 30 Sekunden bestehen bleibt.

Zur Bestrahlung der Vitamin C-haltigen Flüssigkeiten in Stickstoffatmosphäre wurde von uns ein Jenaer Rundkolben aus Molybdän-Uviolglas benutzt, das für ultraviolette Strahlen fast vollkommen durchlässig ist. Am Kolbenhals brachten wir eine Gummikappe an, in die ein Einwegehahn eingelassen war. Durch diesen wurde Stickstoff eingeleitet und sofort anschließend die Flüssigkeit unter Luftabschluß bestrahlt.

Für die biologische Prüfung brachten wir drei Gruppen zu je fünf Meerschweinchen in einen für jede Gruppe besonderen Käfig. Wir fütterten regelmäßig mit trocken erhitztem Heu und Hafer. Als Zusatznahrung erhielt die erste Gruppe gewöhnliche, rohe Milch. Die zweite Gruppe autoklavierte Milch und die dritte Gruppe eine Stunde lang ultraviolett bestrahlte, frische Kuhmilch.

Durch zahlreiche Versuche konnten wir zeigen, daß die Ascorbinsäure in allen bestrahlten Flüssigkeiten durch Ultraviolettlicht mehr oder weniger rasch oxydiert wird. In den folgenden Kurven und Zusammenstellungen sind die Ergebnisse, die wir durch die Einwirkung von ultravioletten Strahlen auf verschiedene biologische Flüssigkeiten erhielten, aufgezeigt.

Veränderung des Vitamin C-Wertes in verschiedenen Flüssigkeiten durch Bestrahlung mit einer gewöhnlichen 60 Watt-Bogenlampe und mit einer Quecksilber-Quarzlampe.

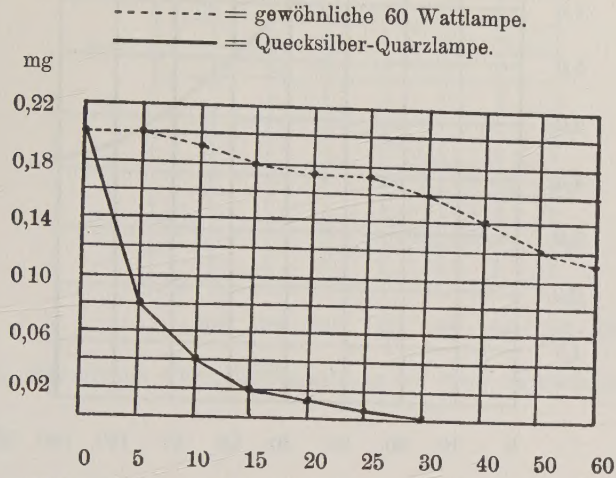


Abb. 1: Wirkung der Ultraviolettbestrahlung auf gewöhnliche, rohe Milch.

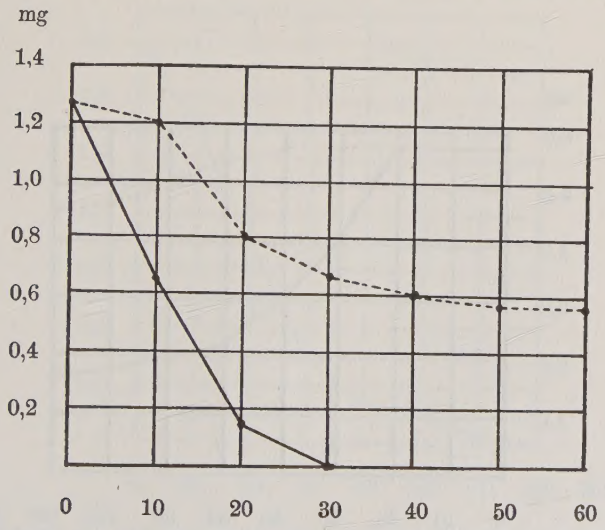


Abb. 2: Wirkung der Ultraviolettbestrahlung auf mit Ascorbinsäure angereicherte Milch (10 mg auf 100 ccm).

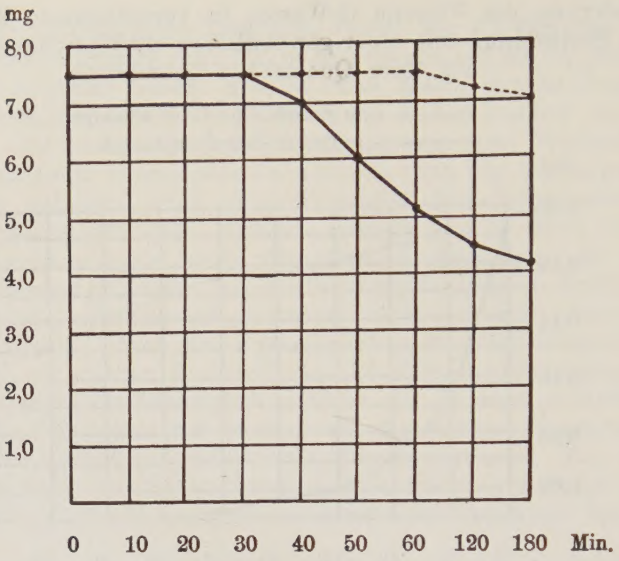


Abb. 3: Wirkung der Ultraviolettbestrahlung auf reinen Apfelsinensaft.

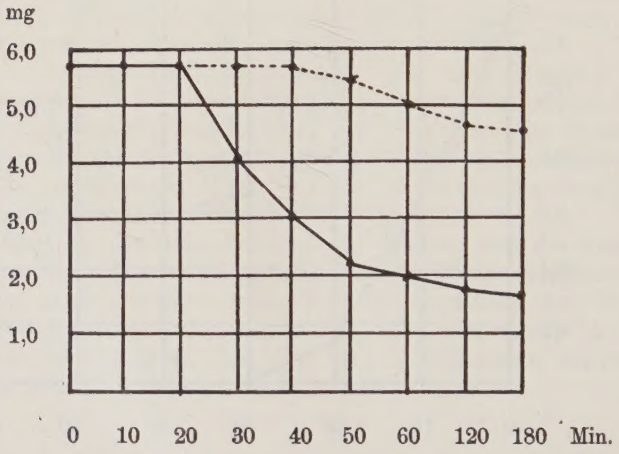


Abb. 4: Wirkung der Ultraviolettbestrahlung auf reinen Zitronensaft.

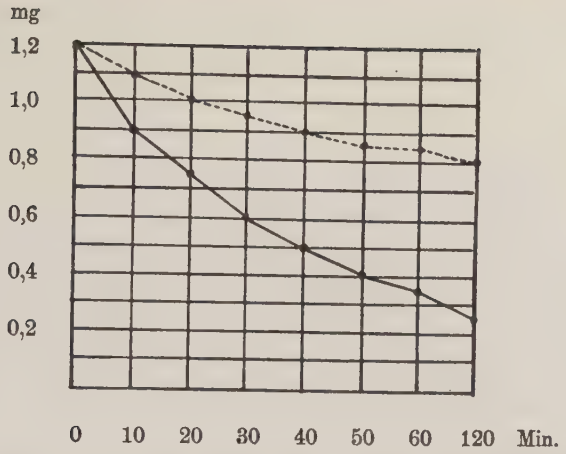


Abb. 5: Wirkung der Ultraviolettbestrahlung auf reine Ascorbinsäurelösung.

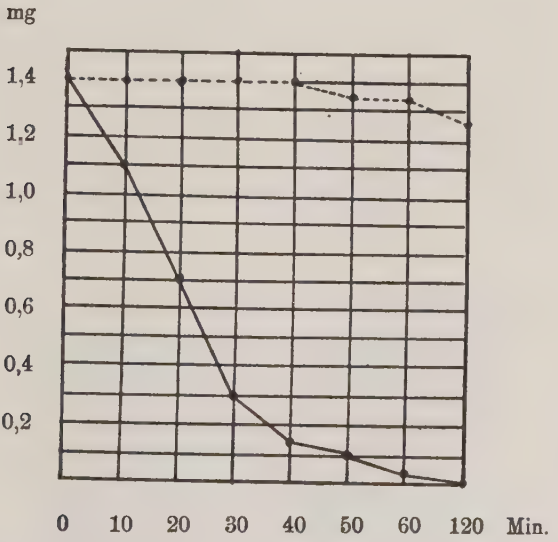
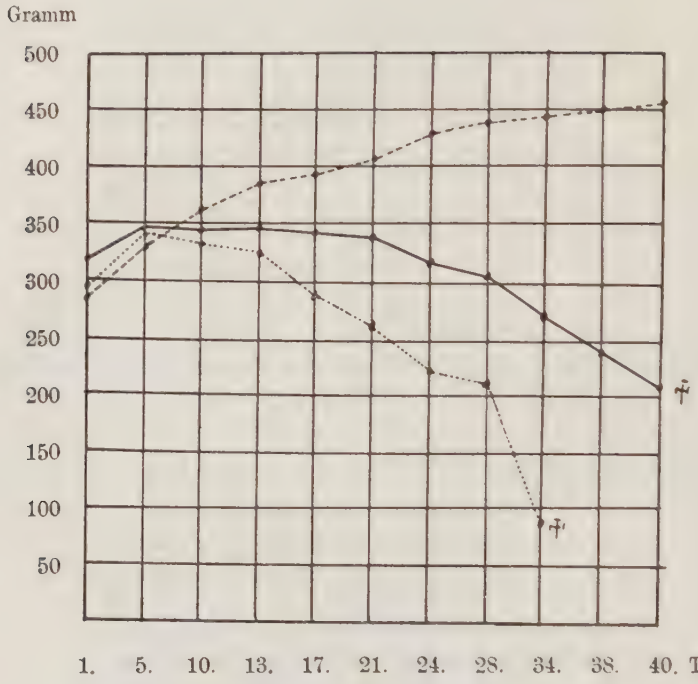


Abb. 6: Wirkung der Ultraviolettbestrahlung auf mit Ascorbinsäure angereicherten und angesäuerten Harn.

Abb. 8: Wachstumskurve der im Versuch verwendeten drei Gruppen von Meerschweinchen.



† = Tod der einzelnen Gruppen.

..... = Durchschnittsgewicht von 5 Meerschweinchen
Futter: erhitztes Heu, Hafer und autoklavierte Milch.

———— = Durchschnittsgewicht von 5 Meerschweinchen
Futter: erhitztes Heu, Hafer und ultraviolettbestrahlte Milch.

- - - - - - - - = Durchschnittsgewicht von 5 Meerschweinchen
Futter: erhitztes Heu, Hafer und gewöhnliche, rohe Milch.

Gehalt einer mit Ascorbinsäure angereicherten Milch	1 Stunde bestrahlt	Einleitung von Schwefelwasserstoff 20 Min.
I. 10,0 mg-% Ascorbinsäure . . .	0,5 mg-%	9,7 mg-%
II. 14 mg-% Ascorbinsäure . . .	1,5 mg-%	13,5 mg-%
III. 12 mg-% Ascorbinsäure . . .	1,2 mg-%	11,8 mg-%

Gehalt einer reinen Ascorbinsäurelösung	1 Stunde bestrahlt	Einleitung von Schwefelwasserstoff 20 Min.
I. 11,0 mg-% Ascorbinsäure . . .	2,5 mg-%	10,6 mg-%
II. 12,5 mg-% Ascorbinsäure . . .	3,0 mg-%	12,2 mg-%

Abb. 7. Titrimetrischer Nachweis der Reduktion von oxydierter l-Ascorbinsäure durch Schwefelwasserstoff.

Bestrahlungsversuche mit Vitamin C-haltigen Flüssigkeiten in einem Jenaer Molybdän-Uviolglas-Rundkolben und Stickstoffatmosphäre.

--------- = gewöhnliche 60 Wattlampe
——————— = Quecksilber-Quarzlampe in Stickstoffatmosphäre.

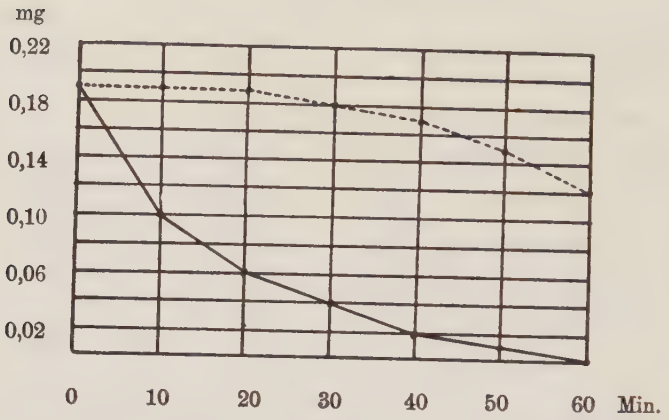


Abb. 9: Wirkung der Ultravioletttbestrahlung auf gewöhnliche, rohe Milch.

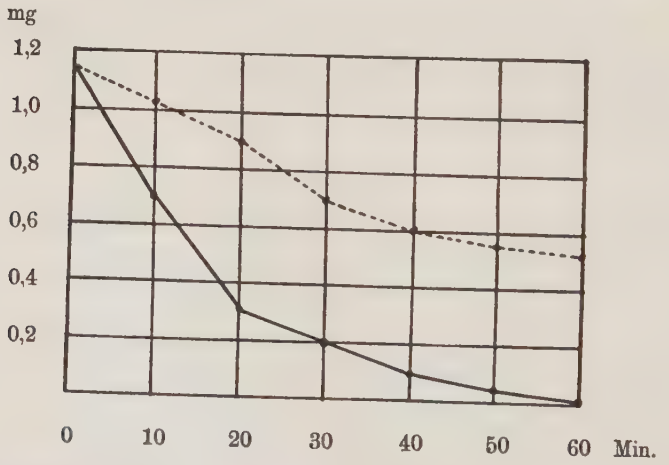


Abb. 10: Wirkung der Ultravioletttbestrahlung auf mit Ascorbinsäure angereicherte Milch (10 mg auf 100 ccm).

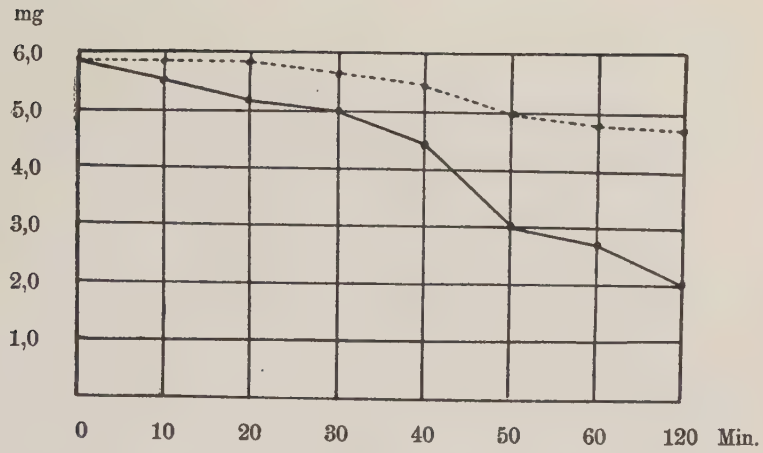


Abb. 11: Wirkung der Ultraviolettbestrahlung auf reinen Zitronensaft.

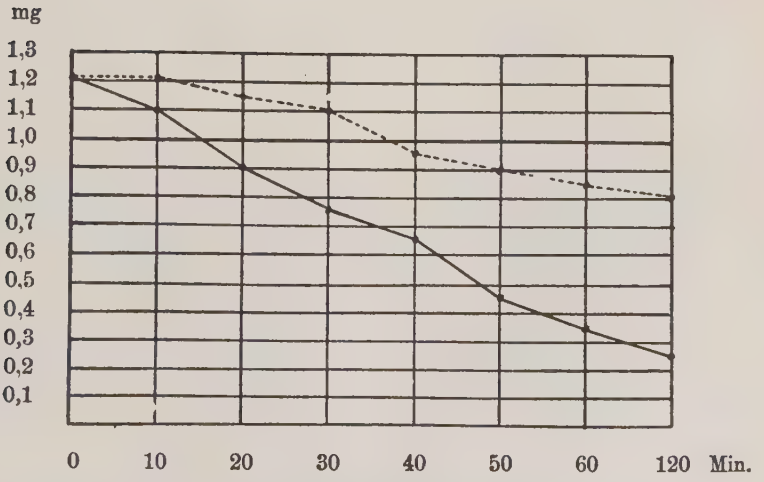


Abb. 12: Wirkung der Ultraviolettbestrahlung auf reine Ascorbinsäurelösung.

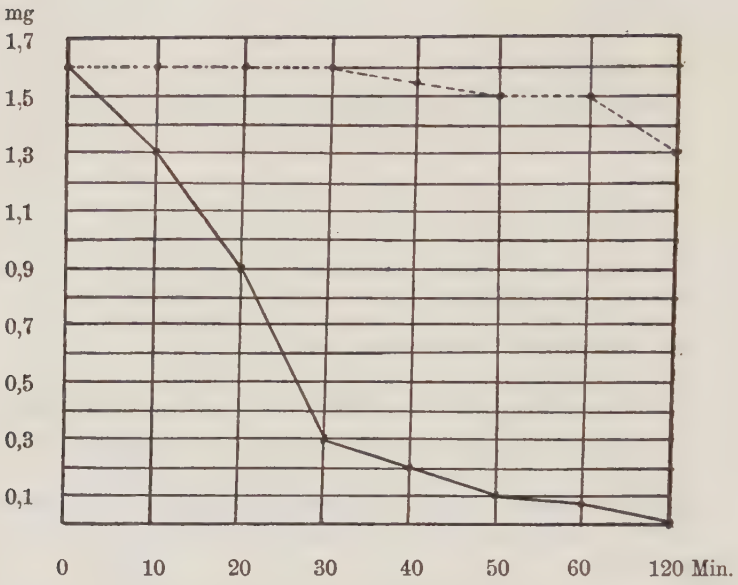


Abb. 13: Wirkung der Ultraviolettbestrahlung auf mit Ascorbinsäure angereicherten und angesäuerten Harn.

Gehalt einer mit Ascorbinsäure angereicherten Milch	1 Stunde bestrahlt	Einleitung von Schwefelwasserstoff 20 Min.
I. 10,5 mg-% Ascorbinsäure . . .	0,85 mg-%	10,35 mg-%
II. 12 mg-% Ascorbinsäure . . .	0,95 mg-%	11,5 mg-%
III. 11 mg-% Ascorbinsäure . . .	1,0 mg-%	11,0 mg-%

Abb. 14: Titrimetr. Nachweis der Redukt. von l-Ascorbinsäure durch Schwefelwasserstoff.

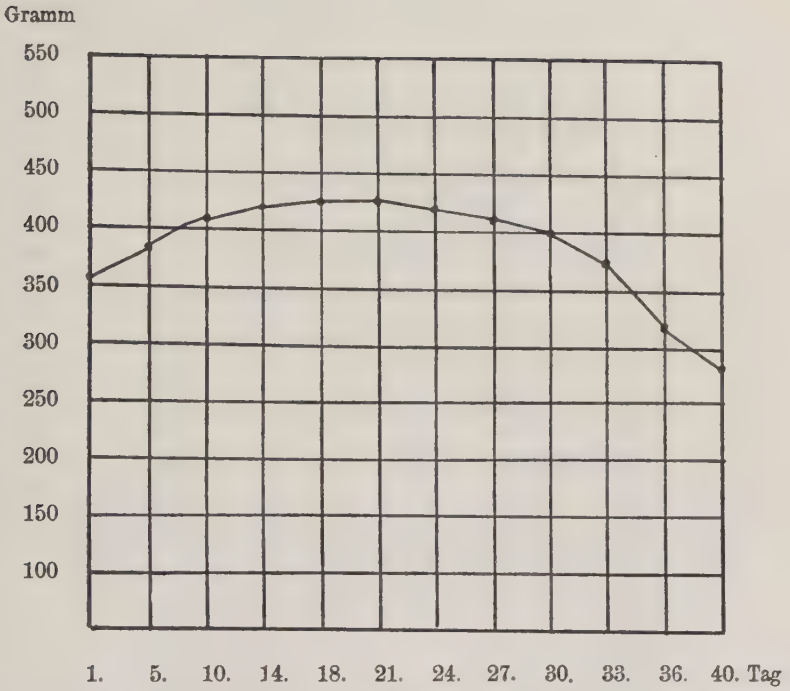


Abb. 15: Wachstumskurve von 5 Meerschweinchen. Futter: erhitztes Heu, Hafer und ultraviolettbestrahlte Milch in Stickstoffatmosphäre.

———— = Durchschnittsgewicht von 5 Meerschweinchen.

Veränderung des Vitamin C-Wertes in verschiedenen Flüssigkeiten durch „Kurzwellenbestrahlung“ und durch gleichzeitige Bestrahlung mit einer 60 Watt Bogenlampe.

- - - - - - - - = gewöhnliche 60 Wattlampe; ———— = Kurzwellenbestrahlung

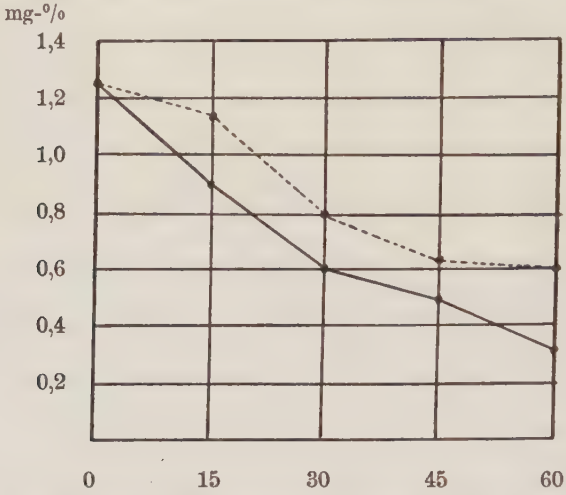


Abb. 16: Wirkung der Kurzwellenbestrahlung auf mit Ascorbinsäure angereicherte Milch (10 mg auf 100 ccm).

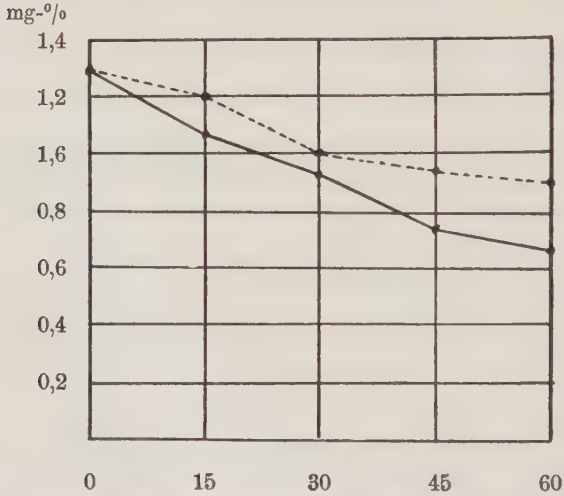


Abb. 17: Wirkung der Kurzwellenbestrahlung auf reine Ascorbinsäurelösung.

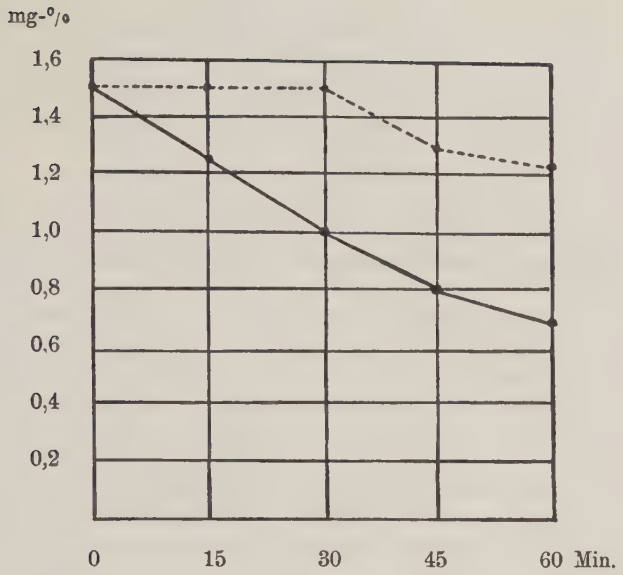


Abb. 18: Wirkung der Kurzwellenbestrahlung auf mit Ascorbinsäure angereicherten und angesäuerten Harn.

Gehalt einer mit Ascorbinsäure angereicherten Milch	1 Stunde bestrahlt	Einleitung von Schwefelwasserstoff 20 Min.
I. 10,3 mg-% Ascorbinsäure . . .	5,2 mg-%	10,2 mg-%
II. 12,5 mg-% Ascorbinsäure . . .	6,5 mg-%	12 mg-%

Abb. 19: Titrimetr. Nachweis der Redukt. von l-Ascorbinsäure durch Schwefelwasserstoff.

Gleichzeitig haben wir in einer Reihe von Untersuchungen feststellen können, daß in den bestrahlten Flüssigkeiten nach Einleitung von Schwefelwasserstoff (20 Minuten) die oxydierte l-Ascorbinsäure durch diesen vollständig reduziert und damit titrimetrisch wieder nachweisbar wird. Denselben Befund konnten wir auch bei den in Stickstoffatmosphäre bestrahlten Flüssigkeiten und den Kurzwellenbestrahlungen erheben, wenn auch die titrimetrisch nachweisbare Abnahme des Vitamin C-Gehaltes nach der Bestrahlung mit Kurzwellen wesentlich geringer war.

Der biologische Versuch am Meerschweinchen ergab einwandfrei, daß die antiskorbutische Wirksamkeit der bestrahlten Flüssigkeiten verloren geht (siehe Abbildung 8). Aus der vorgezeichneten Wachstumskurve ist klar ersichtlich, daß die ultraviolett bestrahlte Milch, genau so wie die autoklavierte zu einer starken Gewichtsabnahme und schließlich zum Tod der Tiere führt. Die übrigen mit normaler, roher Milch gefütterten Tiere zeigen dagegen ein stetig ansteigendes Wachstum. Die ersten sichtbaren Veränderungen der mit bestrahlter und autoklavierter Milch gefütterten Tiere bestand in einer Schwellung der Gelenke der hinteren Extremitäten. Die Tiere saßen meistens unbeweglich auf einer Stelle. Sie verloren immer schneller an Körpergewicht. Das Fell wurde unsauber und struppig und zuletzt verweigerten die Tiere jede Nahrungsaufnahme.

Daß die Tiere wirklich an Skorbut starben, ergab die Sektion. Wir fanden ausgedehnte Blutungen vor allem in dem gelenknahen Gewebe.

Zusammenfassung.

1. Das Vitamin C geht durch die Ultraviolettbestrahlung in reiner, wäßriger Lösung, in der Milch und in Fruchtsäften verloren und ist titrimetrisch nicht mehr nachweisbar.
2. Die Zerstörung des Vitamin C in biologischen Flüssigkeiten vollzieht sich bei Gegenwart von Sauerstoff, wie von Stickstoff in gleicher Weise.
3. Das Vitamin C nimmt in den biologischen Flüssigkeiten auch nach Kurzwellenbestrahlung ab, wenn auch nicht in dem Maße wie bei der Ultraviolettbestrahlung.
4. Obwohl das Vitamin C in den bestrahlten Flüssigkeiten nach Einleitung von Schwefelwasserstoff titrimetrisch wieder nachweisbar ist, beweist die biologische Bestimmung, daß die antiskorbutische Wirksamkeit dabei verloren geht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen erneut, daß weder die Regenerierbarkeit durch Schwefelwasserstoff noch die Reduktion von Dichlorphenolindophenol spezifisch für das Vorhandensein von Vitamin C ist. Es hat sich also gezeigt, daß bei dem Abbau der Dehydroascorbinsäure Substanzen gebildet werden, die mit diesen Reagenzien positiv reagieren, ohne jedoch antiskorbutisch wirksam zu sein.

Zum Schluß der Arbeit sei es mir erlaubt, Herrn Dr. Schröder für die Ueberlassung des Themas und seine liebenswürdigen Ratschläge bei Abfassung der Arbeit meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Schrifttum

Scheer, K.: Med. Klinik 1928, Nr. 1.
Reyher und *Walkoff:* Münch. Med. Wschr. 1928, Nr. 25.
Hottinger, Basel: Klin. Wschr. 1928.
Adam, A.: Klin. Wschr., 7. Jahrg. 1928, Nr. 38.
Moll: Mercks Jahresbericht 1932, S. 9.
— Mercks Jahresbericht 1936, S. 5.
Johnson: Biochemical J. 1933, 27, 4, S. 1287.
Supplee und *Dow.:* Amer. J. Dis. Childr. 41 u. 1353—62 (1931).
Tillmans, Hirsch und *Dick:* Z. f. Untersuchg. d. Lebensmittel 1932, Bd. 63, Heft 3.
Kögel, G.: Strahlenther. 55, 92—95, 1936.
Kasahara M. und *Kawashima:* Klin. Wschr. 1937, Nr. 34, S. 1191.
Schroeder, H.: Münch. Med. Wschr. 1937, Nr. 49, S. 1942.

Lebenslauf

Am 11. 11. 1911 bin ich, Siegfried-Helmut Steinbach, in Stuttgart geboren. Mit 7 Jahren kam ich auf die Heidehofschule in Stuttgart. Im März 1928 wechselte ich auf das Realgymnasium und die Oberrealschule Feuerbach über, in der ich bis zur Reifeprüfung am 4. März 1931 verblieb. Vom März bis Dezember 1931 war ich als Praktikant auf Bauplätzen in Stuttgart tätig. Im Dezember 1931 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen. Ich war bei der medizinischen Fakultät eingeschrieben. Mit 21 Jahren trat ich in die SA und NSDAP ein und legte am 3. Mai 1934 in Tübingen die ärztliche Vorprüfung ab. Mein erstes klinisches Semester verbrachte ich an der Universität in Königsberg. In den Sommerferien war ich als Famulus am Katharinen- und Marienhospital in Stuttgart tätig. Im Winter 1934 bezog ich die Universität München bis zum medizinischen Staatsexamen vom 1. März bis 20. Juni 1937. Am 1. September trat ich als Medizinalpraktikant an der I. medizinischen Klinik in München eine Stelle an. Am 15. März 1938 wechselte ich die Stelle und trat in die chirurgische Abteilung des Städt. Katharinenhospitals in Stuttgart ein. Ab 1. September arbeitete ich an der Universitätsfrauenklinik in München und nahm vom 1. bis 30. November 1938 an einem Lehrgang der Führerschule der deutschen Aerzteschaft in Alt-Rhese teil. Seit 1. April 1939 bin ich auf der Hals-Nasen-Ohrenklinik in Stuttgart tätig.